

DD 253.491

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

# PATENTCHRIFT

(19) **DD** (11) **253 491 A1**

4(51) G 01 N 33/58  
G 01 N 33/74  
G 01 N 33/574

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 295 448 2	(22)	22.10.88	(44)	20.01.88
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Schmidt, H. Eberhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Schmidt, Ingeborg; Kunde, Dieter, Dr. sc. med., DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen Diethylstilbestrol-Konjugats				

(55) Steroidhormonrezeptornachweis, Fluoreszenzhistochemie, Kompetitor Estrogen, Diethylstilbestrol, Trägerprotein, Diethylstilbestrolkonjugat

(57) Das Konjugat eignet sich als Kompetitor beim fluoreszenzhistochemischen Steroidhormon-Rezeptornachweis und gewährleistet dessen Spezifität. Das synthetische Estrogen Diethylstilbestrol (DES) wird wasserlöslich gemacht, indem zunächst DES-Säure hergestellt und dann eine größere Zahl von DES-Säureresten an die freien Aminogruppen eines Trägerproteins gekoppelt wird.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

**Erfindungsanspruch:**

1. Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen Diethylstilbestrol-Konjugats als Kompetitor beim fluoreszenzhistochemischen Steroidhormon-Rezeptornachweis, **dadurch gekennzeichnet**, daß
  - $\gamma$ -Brombuttersäureethylester mit überschüssigem DES (II) über wasserfreiem Kaliumkarbonat zu einem DES-ethoxycarbonylpropylether (IV) kondensiert,
  - der DES-ethoxycarbonylpropylether zum DES-carboxypropylether (V), der sogenannten DES-Säure, vorseift und
  - eine größere Zahl von DES-Säureresten nach der Mischanhydridtechnik an die freien Aminogruppen eines Trägerproteins, z. B. eines Rinder- oder Humanserumalbumins oder anderen geeigneten Serumproteins, gekoppelt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Trägerprotein Serumproteine, insbesondere RSA oder HSA, verwendet werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß mehr als 15, aber weniger als 40 DES-Reste, vorzugsweise 25–40 DES-Reste, an ein Trägerproteinmolekül gekoppelt werden.

Hierzu 1 Seite Formeln

**Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen Diethylstilbestrol-Konjugates, das sich als Kompetitor beim fluoreszenzhistochemischen Steroidhormon-Rezeptornachweis eignet und damit die Spezifität dieses Nachweises gewährleistet.

**Charakteristik der bekannten technischen Lösungen**

Das Prinzip der sogenannten biochemischen Rezeptorbestimmungsmethoden besteht nach Homogenisation des zu prüfenden Gewebes in einer Inkubation des erhaltenen Zytosols mit einer bekannten Menge eines radioaktiv markierten Steroidhormons, anschließender Trennung des am Rezeptorprotein gebundenen Hormonanteils vom freien Hormon und Messung der Radioaktivitätsverteilung. Diese Trennung kann mittels dextranbeschichteter Aktivkohle und Zentrifugation, etwas aufwendiger durch Gradientenzentrifugation oder auch durch Anwendung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgen. In allen Fällen kann durch Einsatz einer nicht markierten Kompetitorsubstanz zwischen sättigbarer spezifischer Rezeptorbindung und nicht-sättigbarer unspezifischer Bindung differenziert werden. Alle biochemischen Rezeptorbestimmungsverfahren weisen jedoch Nachteile auf. Sie sind zeitaufwendig und setzen die Verfügbarkeit spezieller Meßgeräte voraus, so daß sie nur in klinisch-chemischen Speziallaboratorien durchgeführt werden können. Aus methodischer Sicht wird als nachteilig angesehen, daß durch die Gewebekomposition einer relativ großen Gewebeprobe von wenigstens 500 mg keine Differenzierung zwischen rezeptorpositiven und rezeptornegativen Zellklonen möglich ist.

Als Alternativlösung wurde 1978 von Sin Heng Lee ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren zum gleichzeitigen Nachweis zellulärer Estradiol- und Progesteronrezeptoren von menschlichem Mammakarzinom entwickelt (S. H. Lee, „Cytochemical Study of Estrogen Receptor in Human Mammary Cancer“, Amer. J. clin. Pathol. 70 [1978], 197–203; S. H. Lee: „Cellular Estrogen and Progesterone Receptors in Mammary Carcinoma“, Amer. J. clin. Pathol. 73 [1980], 323–329). Bei dieser histochemischen Methode werden Gefrierschnitte menschlicher Mammakarzinome mit 17 $\beta$ -Estradiol-6-carboxymethyl-Rinderserumalbumin-fluoreszeinisothiozyanat (E<sub>2</sub>-6-CMO-RSA-FITC) bzw. 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteronhemisuccinat-Pinderserumalbumin-tetramethylrhodaminisothiozyanat (Prog-HS-RSA-TMRITC) inkubiert und nach Auswaschen des Reagenzüberschusses unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Benutzung entsprechender Filter bewertet. Estrogenbindende Rezeptorproteine in den Karzinomzellen sind durch eine leuchtende apfelgrüne Färbung von den progesteronbindenden Rezeptorproteinen zu unterscheiden, die orangerot fluoreszieren. Das verwendete Estradiol-6-CMO-RSA-FITC-Konjugat enthielt durchschnittlich 24–30 Estradiol- und 5–8 FITC-Reste pro RSA-Molekül, das entsprechende 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron-HS-RSA-TMRITC-Konjugat 25–30 Mole Progesteron und 4–6 Mole TMRITC pro Mol RSA. Der relativ geringe labortechnische Aufwand ermöglicht es, wesentliche Vorteile dieser histochemischen Methode besteht jedoch darin, daß es möglich ist, die Verteilung fluoreszierender und nichtfluoreszierender Zellklone auf dem Gewebsschnitt eines Mammakarzinoms zu erfassen. Besonders interessant sind hierbei die Randgebiete eines Karzinoms. Für die Einschätzung des Primärtumors ist es von großer Bedeutung, ob in diesem Bereich rezeptorproteinpositive oder -negative Karzinomzellen gefunden werden, da die hier infiltrierenden, in Lymph- und Blutgefäße einbrechenden Karzinomzellen die Prognose entscheidend bestimmen. Die zur Anfertigung der Schnitte benötigten Gewebsmengen sind gering. Es empfiehlt sich, Gewebblöcke aus verschiedenen Bereichen des Tumors, unbedingt jedoch Tumorrandgebiet und -zentrum, anzufertigen, um die in den einzelnen Tumorebenen unterschiedlichen Fluoreszenzbilder sicher bewerten zu können.

Aus topographischen Untersuchungen geht hervor, daß zwischen den biochemischen Steroidhormon-Rezeptorbestimmungsmethoden und dem fluoreszenzhistochemischen Nachweis keine Übereinstimmung besteht. Vielmehr wurde beobachtet, daß auf den Gewebsschnitten mehr fluoreszierende Steroidkonjugatmoleküle gebunden werden, als sogenannten „klassischen Rezeptorbindungsstellen“ entspricht. Das bedeutet, daß es sich bei den fluoreszenzbindenden Schnittproteinen nicht oder zumindest nicht allein um Rezeptorproteine handelt. Kritische Arbeitskreise bezeichnen den fluoreszenzhistochemischen Rezeptornachweis deshalb auch treffender als eine Methode zum Nachweis von

Bindungsproteinen für Steroidhormone, deren Auffinden in Korrelation zu klinischen Befunden der Mammakarzinompatientinnen und ihrer Reaktion auf hormontherapeutische Maßnahmen steht. Wie beim biochemischen Estradiolrezeptortest kann auch die Spezifität des fluoreszenzhistochemischen Nachweises von Steroidhormon-Bindungsproteinen durch Kompetitionsversuche gesichert werden. Auf diese Weise ist es möglich, unspezifische Bindungsstellen, die z. B. an Proteinen der Bindegewebsstrukturen oder nekrotischen Gewebsbereichen vorhanden sind, von den spezifischen Bindungsproteinen, deren Fluoreszenz vollständig ausgelöscht werden kann, zu unterscheiden. Als Kompetitorsubstanzen sind Verbindungen geeignet, die entweder aufgrund ihrer einem Steroidhormon ähnlichen molekularen Struktur ein höheres Bindungsvermögen an die Rezeptorbindungsstellen besitzen, oder solche, die bei der Vorinkubation der Gefrierschnitte als Inhibitoren wirken, wenn sie in höherer Konzentration als die Steroidhormon-RSA-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate angewendet werden.

Steroidähnliche Struktur weisen beispielsweise die synthetischen Estrogene Tamoxiphen (I) und Diethylstilbestrol (II) auf. Beide Verbindungen sind jedoch wasserunlösliche Substanzen. Ihre Löslichkeit in einem wäßrigen Puffersystem reicht nicht aus, um eine deutliche und damit beweiskräftige Hemmung der Fluoreszenzmarkerbindung zu bewirken. Um die Löslichkeit zu verbessern, werden deshalb für Kompetitionsversuche schwach alkoholische oder glyzerinhaltige Pufferlösungen verwendet (S. H. Lee: The Histochemistry of Estrogen Receptors, Histochemistry 71 (1981), 491-500). Hierbei treten jedoch Schwierigkeiten durch Denaturierung der Schnittoberfläche als Folge der Alkoholwirkung auf, so daß auch die Bindungsfähigkeit der Rezeptorproteine verlorengeht. Eine schwache Hemmung wird durch Verwendung von 17 $\beta$ -Estradiol-6-( $\alpha$ -carboxymethyl)-oxim (III) erzielt, eine noch bessere Blockierung kann man mit dem wasserlöslichen 17 $\beta$ -Estradiol-6-CMO-RSA-Konjugat erreichen. Dieser Kompetitor unterscheidet sich von der Testsubstanz also lediglich dadurch, daß er keinen Fluoreszenzfarbstoff enthält. Zusammenfassend wird festgestellt, daß es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine befriedigende Lösung für die aufgezeigte Problemstellung gibt. Das macht verständlich, warum kommerzielle Testbestecke zum fluoreszenzhistochemischen Nachweis von Steroidhormon-Bindungsproteinen gegenwärtig noch ohne Kompetitorsubstanzen angeboten werden.

### Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist es, das als Kompetitor geeignete synthetische Estrogen Diethylstilbestrol (DES) wasserlöslich zu machen, ohne daß dabei seine Eigenschaft, mit dem Steroidhormon-Bindungsprotein der Karzinomzellen bereits in relativ geringer Konzentration eine spezifische Bindung einzugehen, verlorengeht.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen Diethylstilbestrol-Konjugates anzugeben, bei dem kein Verlust des spezifischen Bindungsvermögens gegenüber Steroidhormon-Bindungsproteinen eintritt. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß

- $\gamma$ -Brombuttersäureethylester mit überschüssigem DES (II) über wasserfreiem Kaliumkarbonat zu einem DES-ethoxycarbonylpropylether (IV) kondensiert,
- eine größere Zahl von DES-Säureresten nach der Mischanhydridtechnik an die freien Aminogruppen eines Trägerproteins, z. B. eines Rinder- oder Humanserumalbumins oder anderen geeigneten Serumproteins, gekoppelt wird.

Das molare Verhältnis der durchschnittlich an ein RSA-Molekül gekoppelten DES-Reste hängt davon ab, in welchem stöchiometrischen Verhältnis DES-Säure und RSA bei der Kopplungsreaktion eingesetzt werden. Es kann durch spektralphotometrische Messung von DES-RSA-Konjugatlösungen und RSA-Lösungen gleicher Konzentration bei einer Wellenlänge von 272,5 nm, dem Minimum des RSA-Spektrums, bestimmt werden. Die gemessenen Extinktionsdifferenzen werden auf DES-Säure ( $\epsilon = 11890$ ) bezogen. Die obere Grenze liegt etwa bei 45 DES-Resten pro RSA-Molekül. Es wurde gefunden, daß ein DES-RSA-Konjugat mit durchschnittlich 25 bis maximal 40 DES-Resten pro RSA-Molekül optimale Eigenschaften als Kompetitor beim fluoreszenzhistochemischen Nachweis von Steroidhormon-Bindungsproteinen aufweist. Noch in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M in phosphatgepufferter Kochsalzlösung wird eine komplette Hemmung der anschließenden Fluoreszenzmarkierung erzielt. Die Hemmwirkung ist abhängig vom molaren Verhältnis der auf RSA entfallenden DES-Reste. Ein Konjugat mit weniger als 15 DES-Resten pro RSA-Molekül ist zwar sehr gut wasserlöslich, bei der angegebenen niedrigen Konzentration ist die Blockierung jedoch nicht vollständig. Enthält das Konjugat mehr als durchschnittlich 40-42 DES-Reste pro RSA-Molekül, ist die Hemmung zwar total, aber die Wasserlöslichkeit wird durch den hohen DES-Anteil wesentlich verringert, so daß sich Schwierigkeiten bei der praktischen Durchführung des Kompetitionstestes ergeben.

Die Arbeitsschritte beim fluoreszenzhistochemischen Kompetitionstest mit dem DES-RSA-Konjugat sind die gleichen wie bei dem bekannten und beschriebenen Rezeptorsuchtest mit Estradiol-RSA-FITC-Konjugat: Die getrockneten, 8-10  $\mu$ m dicken unfixierten Kryostatschnitte werden zum Zwecke der Rehydratation zunächst mit wenigen Tropfen einer 2%-igen RSA-Lösung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung vom pH-Wert 7,6 (PBS-Puffer) benetzt und dabei etwas bewegt, um eine gleichmäßige Verteilung der aufgetragenen Lösung zu erzielen. Schon nach ca. 1 Minute werden sie mit PBS-Puffer wieder abgewaschen. Nunmehr werden die Gewebsschnitte mit jeweils 0,15-0,20 ml der Kompetitorlösung bedeckt, deren Konzentration 3-5 mg/ml DES-RSA-Konjugat in phosphatgepufferter Kochsalzlösung beträgt, und 2 Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Entfernung der überschüssigen Kompetitorlösung wird danach gründlich mit PBS-Puffer gespült. Der fluoreszenzhistochemische Nachweis von Steroidhormon-Bindungsproteinen sowie die fluoreszenzmikroskopische Auswertung werden anschließend in bekannter Weise ausgeführt.

### Ausführungsbeispiel

Es soll ein DES-Trägerprotein-Konjugat hergestellt werden, bei dem als Trägerprotein Rinderseumalbumin (RSA) eingesetzt wird und das etwa 25 DES-Reste pro RSA-Molekül aufweist. Der von DES ausgehende Syntheseweg ist dreistufig und verläuft über die Zwischenprodukte DES-ethoxycarbonylpropylether (IV) und DES-carboxypropylether (V).

**DES-ethoxycarbonylpropylether**

2,5g DES (I; 9,32 mmol) werden in 10–15 ml Methylethylketon gelöst, mit 1,5g  $\gamma$ -Brombuttersäureester (7,69 mmol) und 2g pulverisierter wasserfreier Pottasche ( $K_2CO_3$ ) versetzt und 8 Stunden unter Rückfluß gekocht. An der Gefäßwandung scheidet sich dabei Kaliumbromid ab. Nach Abkühlung wird das Gemisch mit 50 ml Wasser versetzt und erschöpfend ausgeethert (3mal 100 ml). Zur Entfernung von nicht umgesetztem DES wird der Etherextrakt mit 10%iger NaOH-Lösung und anschließend zweimal mit Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknung über Natriumsulfat wird der Ether abgedunstet. Der sirupöse Rückstand enthält den DES-monoether IV.

**DES-carboxypropylether**

Ohne Isolation von IV wird der Rückstand durch Kochen mit 50 ml 2 N NaOH verseift. Beim vorsichtigen Ansäuern fällt der DES-carboxypropylether, die sogenannte DES-Säure V, als flockiger Niederschlag aus, der abgesaugt und wieder in Ethylalkohol gelöst wird. Zur noch warmen Lösung wird Wasser bis zur gerade einsetzenden Kristallisation zugefügt, die beim Abkühlen fortschreitet.

Ausbeute: 1,28 g (38,8% der Theorie)

**DES-RSA-Konjugat mit durchschnittlich 25 DES-Resten/RSA**

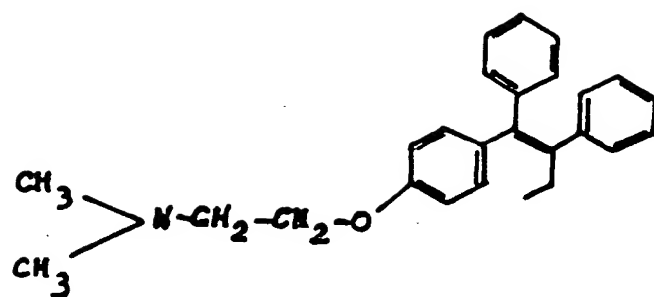
1 g V (2,82 mmol) wird in 40 ml Dioxan (über KOH getrocknet und destilliert) gelöst und mit einer Lösung von 463  $\mu$ l Triethylamin (3,32 mmol) in 10 ml Dioxan versetzt. Nach Abkühlung auf die Reaktionstemperatur von ca. 6°C wird dieses Gemisch portionsweise mit einer ebenfalls auf 6°C gebrachten Lösung von 477  $\mu$ l Chlorkohlensäureisobutylester (3,85 mmol) in 5 ml trockenem Dioxan versetzt. Das Reaktionsgemisch erfährt hierbei eine Trübung. Es wird unter gelegentlichem Umschütteln zur Bildung des Mischanhydrids 1 Std. bei 6°C im Kühlschrank stengelassen. Die Mischanhydridlösung wird anschließend ebenfalls portionsweise (ca. 5 ml in 10-Min.-Abständen) unter kräftigem Umschwenken in eine Lösung von 3,95 g RSA (0,056 mmol) in 100 ml Wasser pipettiert, die zunächst mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt, dann nach und nach mit 100 ml Dioxan versetzt, nunmehr auf einen pH-Wert von 8,5–9,5 gebracht und danach ebenfalls auf 6°C abgekühlt wurde. Vor jeder neuen Zugabe wird der pH-Wert der RSA-Lösung geprüft und mit 1 N NaOH wieder auf 8,5–9,5 gebracht. Eine Stunde nach der letzten Zugabe wird der pH-Wert noch einmal kontrolliert. Die Reaktionszeit beträgt 2 Stunden, doch kann das Reaktionsgemisch auch über Nacht im Kühlschrank stengelassen werden. Die Aufarbeitung erfolgt zweckmäßigerweise durch Dialyse im Kühlraum. Zur Abtrennung der Hauptmenge an Dioxan sowie der Kopplungsreagenzien wird zunächst ein ca. 25 cm langer Zellophan-Dialysierschlauch größeren Durchmessers (etwa 45 mm) verwendet, der in einen mit Wasser gefüllten 1-l-Meßzylinder eingehängt wird. Das Wasser wird tagsüber mehrfach gewechselt. Danach wird das Flüssigkeitsvolumen durch Vakuumdialyse mit Hilfe eines ca. 15 cm langen und 1 cm breiten Visking-Dialysierschlauches (Serva, Heidelberg, BRD) auf 8–10 ml eingeengt. Reste an dialysierbaren Anteilen werden durch Spülen mit Wasser entfernt. Dann wird das Volumen weiter eingeengt, so daß der grünlich-graue Rückstand im Dialysierschlauch gallertartig fest wird. Um ihn verlustfrei zu gewinnen, wird der Dialysierschlauch aufgeschnitten und die Membran abgezogen. In einem Kristallisierschälchen wird die gallertartige Masse auf –20°C abgekühlt und lyophilisiert. Das mechanisch zerkleinerte Konjugat ist grau-grünlich gefärbt. Die spektralphotometrische Bestimmung ergab als Mittelwert 24,5 DES-Reste pro RSA-Molekül.

Ausbeute: 3,67 g (82,6% der Theorie)

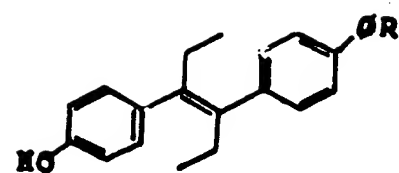
Anstelle von RSA kann DES auch an Humanserumalbumin (HSA) gekoppelt werden. Hierzu werden 708,8 mg V (2,0 mmol) in 40 ml Dioxan gelöst und 500  $\mu$ l Triethylamin (3,58 mmol), das vorher mit 10 ml Dioxan verdünnt wurde, zugefügt. Wie bereits ausgeführt, wird das Gemisch auf ca. 6°C abgekühlt, ehe portionsweise eine ebenfalls 6°C kalte Lösung von 500  $\mu$ l Chlorkohlensäureisobutylester (3,83 mmol) in 5 ml Dioxan zugegeben wird. Die Mischanhydridbildung erfolgt bei Kühlschranktemperatur im Verlaufe einer Reaktionszeit von 1 Stunde.

Inzwischen werden 2,7 g HSA (0,04 mmol) in 60 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,0 gebracht, in kleineren Anteilen 60 ml Dioxan zugegeben, danach ein pH-Wert von 8,5–9,5 eingestellt und diese HSA-Lösung ebenfalls auf 6°C abgekühlt. In 10minütigem Abstand werden jeweils 5 ml der DES-Mischanhydridlösung unter Umschwenken in die HSA-Lösung pipettiert. Vor jeder neuen Zugabe wird der pH-Wert kontrolliert und mit einigen Tropfen 1 N NaOH wieder auf den Ausgangswert eingestellt. Nach mindestens 2stündiger Reaktionszeit wird in der wie oben angegebenen Weise mittels Dialyse und Vakuumdialyse aufgearbeitet. Das nach Lyophilisation und mechanischer Zerkleinerung erhaltene Konjugat war gelblich-bräunlich gefärbt. Durch spektralphotometrische Messung wurde ein Verhältnis von durchschnittlich 38,9 DES-Resten pro HSA-Molekül gefunden.

Ausbeute: 2,85 g (88,3% der Theorie)

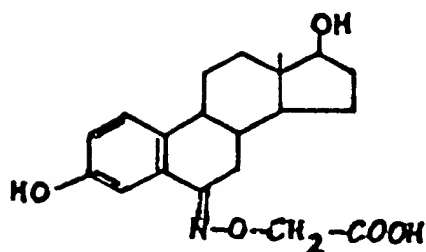


I



R = H

II



III

R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

IV

R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOH

V

R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO-(NH-RSA)<sub>x</sub>

VI